مطالعه هیستوپاتولوژی اثرات محافظتی عصاره الکلی کلاله زعفران بر تغییرات بافتی کبد و کلیه در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان

داریوش مهاجری[1*]، مهران مسگری عباسی[2]، غفور موسوی[3]، یوسف دوستار[1]، بهرام عمواوغلی تبریزی[3]،

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۲. مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات *daryoushmohajeri@yahoo.com*

(دریافت مقاله: ، پذیرش نهایی:)

چکیده

دیابت ملیتوس اختلالی متابولیکی است که گریبانگیر بشر بوده و از شیوع بالایی در سراسر جهان برخوردار می‌باشد. نارسایی‌های کبدی و کلیوی از عوامل عمده مرگ و میر در این بیماری شناخته شده‌اند. گیاهان بسیاری از سراسر جهان جهت مداوای افراد دیابتیک توصیه شده‌اند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی عصاره الکلی کلاله زعفران بر بافت کبد و کلیه موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان می‌باشد. بدین منظور، ۷۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، به‌طور تصادفی در ٦ گروه ۱۲ تایی (شاهد سالم، سالم تیمار با عصاره، دیابتیک ملایم، دیابتیک ملایم تیمار با عصاره، شدیداً دیابتیک و شدیداً دیابتیک تیمار با عصاره) توزیع گردیدند. مؤثرترین دز کاهنده قند خون عصاره (٤٠ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، به‌شکل محلول در سالین نرمال (۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌صورت داخل صفاقی و به‌مدت ۳۰ روز متوالی به گروه‌های تیمار با عصاره تزریق شد. گروه‌های شاهد نیز به‌همان روش، سرم فیزیولوژی دریافت کردند. ٤ ساعت بعد از آخرین تزریق عصاره، هم‌زمان همه موش‌ها با ایجاد جابه‌جایی در مهره‌های گردن به راحتی کشته شدند. نمونه‌های بافتی اخذ شده از کبد و کلیه تمامی موش‌ها در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار گردید. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقطع، برش‌های هیستولوژی به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. آسیب‌شناسی بافتی کبد و کلیه موش‌های دیابتی شده، حاکی از بروز تغییرات دژنراتیو در هپاتوسیت‌های اطراف وریدچه مرکزی، گلومرولیت غشایی- افزایشی، تورم سلول‌های پوششی لوله‌های ادراری، ارتشاح لمفوسیتی، پرخونی و خونریزی بود. آسیب‌های مذکور در موش‌های شدیداً دیابتیک بارزتر بود. در مشاهدات ریزبینی، کبد و کلیه موش‌های دیابتیک تیمار با عصاره زعفران تقریباً طبیعی به‌نظر می‌رسیدند. نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که عصاره الکلی کلاله زعفران مانع از بروز آسیب‌های زود هنگام کبد و کلیه در موش‌های صحرایی دیابتیک تجربی می‌گردد. بنابراین، این عصاره می‌تواند پس از انجام کارآزمایی‌های شاهددار اتفاقی، به‌عنوان عاملی مؤثر در پیش‌گیری نفروپاتی و هپاتوپاتی دیابتی توصیه گردد.

مجله علوم تخصّصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ۱۳۸۷، دوره ۲، شماره ۲، ۱٤۳-۱۲۹.

کلمات کلیدی: زعفران، کلاله، عصاره الکلی، دیابت، آلوکسان، هیستوپاتولوژی

مقدمه

بیماری دیابت اختلالی متابولیکی است که از دیرباز و با میزان وقوع بالا (۵-٤) گریبانگیر بشر بوده و با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین منجر به افزایش قند خون می‌گردد. نارسایی‌های کبدی و کلیوی دیابت نیز از عوامل عمده مرگ و میر در بیماران دیابتی شناخته شده‌اند (Pickup and William, 1997). داروهای صناعی پائین‌آورنده میزان قند خون نه تنها قادر به کنترل آسیب‌های بافتی در این بیماری نیستند (Liu et al., 2008)، بلکه می‌توانند باعث بروز عوارض جانبی متعددی گردند (Akhtar and Iqbal, 1991; Holman and Turner, 1991). همچنین استفاده از این داروها در دوران بارداری عاری از خطر نیست (Larner, 1985). گیاهان دارای نقش و جایگاه مهمی در بین عوامل جدید دارویی می‌باشند (Luo et al., 1998)، و تقاضا برای داروهای جدید خوراکی بدون عوارض جانبی همچنان ادامه دارد. گروه کثیری از گیاهان، ادویه‌جات و سایر اجزای گیاهی، جهت درمان دیابت از سراسر دنیا گزارش شده است (Kesari et al., 2005; Gupta et al., 2005; Ivorra et al., 1989; Marles and Famsworth, 1995) که می‌توانند جهت توسعه عوامل دارویی یا به‌عنوان یک افزودنی مجاز خوراکی به درمان‌های موجود، مدّ نظر قرار گیرند (Bailey and Day, 1989). لکن، تعداد اندکی از گیاهان مورد استفاده جهت درمان دیابت از لحاظ علمی مورد تأیید قرار گرفته‌اند و کمیته تخصّصی سازمان بهداشت جهانی نیز تأکید بر توجه و رسیدگی بیشتری در این مورد دارد (WHO, 1980).

زعفران به‌عنوان گرانترین ادویه در جهان، متعلق به خانواده Iridaceous بوده و به‌طور گسترده‌ای در ایران، هندوستان و یونان کشت داده می‌شود. به‌عنوان یک گیاه دارویی، زعفران برای درمان اختلالات معدی و سوء هاضمه و همچنان افزایش اشتهاء و ضد اسپاسم کاربرد دارد. گزارش شده است که زعفران دارای اثرات کاهنده چربی خون، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان نیز می‌باشد. همچنین از زعفران برای درمان اختلالات عصبی و آسم استفاده می‌شود (Rios et al., 1996; Abe and Saito, 2000; Abdullaev, 2002). عصاره آبی زعفران و ماده مؤثره آن یعنی کروسین (Crocin) در پیش‌گیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی برقراری مجدد خون (Ischemia-reperfusion) در موش‌های صحرایی، مفید می‌باشند (Hosseinzade et al., 2005). عصاره زعفران سلول‌های کبدی موش‌های صحرایی را در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو نیز محافظت می‌کند (Giaccio, 2004). زعفران و ماده مؤثره آن یعنی کروسین مانع از مرگ آپوپتوزی سلول‌های عصبی در اثر عوامل القاءگر داخلی و خارجی می‌شود (Soeda et al, 2001). استفاده توأم زعفران و سیس‌پلاتین (Cisplatin) در موش‌های صحرایی باعث کاهش بیشتر قند خون در مقایسه با مصرف سیس‌پلاتین به تنهایی، می‌شود (El Daly, 1998). پزشکان نامی که در قرن گذشته می‌زیسته‌اند، برای زعفران خواص درمانی دیابت قائل بودند و از آن برای درمان آن استفاده می‌نموده‌اند (کافی، ۱۳۸۱، ۳۲ و ابراهیم زاده و همکاران، ۱۳۸۵، ۵۸۸-۵۸۷). در طب سنتی هند نیز، از زعفران برای درمان دیابت استفاده می‌شده است (Duke, 2000). به‌هر حال نقش محافظتی عصاره زعفران در مورد آسیب‌های زود هنگام دیابتی کبد و کلیه تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته و گزارشی مبنی بر نقش فارماکولوژیکی آن در این زمینه، در دست نمی‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی عصاره الکلی کلاله زعفران بر هپاتوپاتی و نفروپاتی در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان با جنبه هیستوپاتولوژی می‌باشد.

مواد و روش‌کار

مواد دارویی:

زعفران مورد استفاده در این بررسی از شرکت نوین زعفران (مشهد، ایران) تهیه و توسط گروه کشت و توسعه انستیتو گیاهان دارویی تهران تأیید گردید. برای تهیّه عصاره، ابتدا زعفران به‌صورت پودر تهیّه و سپس به کمک حلال اتانولی (۱۰ گرم پودر در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه) اقدام به عصاره‌گیری توسط روش ماسراسیون (Maceration) شد. عمل عصاره‌گیری سه بار تکرار گردید و عصاره‌های حاصله توسط دستگاه روتاری اواپوراتور تحت خلأ کاملاً خشک گردید. عصاره خشک شده تا زمان استفاده در یخچال و تحت شراط انجماد نگهداری شد.

تهیه و نگهداری حیوانات:

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar)، با وزن تقریبی ۲۱۰-۲٤۰ گرم و سن ۱۰ هفته از محل پرورش و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری گردیدند. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای همه گروه‌ها یکسان و به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲۱ ± ۲ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های مخصوص و در بستری از پوشال، در نظر گرفته شد. آب به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت. پس از یک هفته عادت به وضعیت جدید، مطالعه روی موش‌ها انجام گردید. در این مطالعه موارد اخلاقی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز قرار گرفت.

ایجاد دیابت در موش‌های صحرایی:

پس از ۱۵ ساعت پرهیز غذایی، آلوکسان منوهیدرات (Sigma chemicals, USA) در سرم فیزیولوژی استریل حل و با دز ۱۲۰ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌طور داخل صفاقی به موش‌ها تزریق گردید. جهت تأیید دیابت، میزان قند خون پس از تزریق آخرین دز آلوکسان، به‌طور روزانه مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس میزان قند خون (Fasting blood glucose) موش‌ها به دو گروه دیابتیک ملایم با میزان قند خون ۲۵۰-۱۲۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و شدیداً دیابتیک با میزان قند خون ۳۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، به‌طور قراردادی تقسیم شدند (Gupta et al., 2005).

اندازه‌گیری‌ها:

کنترل منظم قند خون توسط دستگاه گلوکومتر (Accu-chek sensor of Roche Diagnostics, Germany) و سنجش هفتگی آن با استفاده از روش گلوکز اکسیداز (Biomerieux Laboratory, France) انجام شد. نمونه خون نیز از سینوس پشت کره چشم (retro-orbital plexus) اخذ گردید.

تعیین موثرترین دز عصاره الکلی کلاله زعفران، در کاهش میزان قند خون در موش‌های صحرایی سالم:

تعداد ۲٤ سر موش صحرایی سالم با ۱۸ ساعت پرهیز غذایی به ٤ گروه ٦تایی تقسیم شدند. گروه ۱ سالین نرمال ایزوتونیک (ISS) به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌عنوان کنترل و گروه‌های ۲ تا ٤ دزهای ۲۰، ٤۰ و ۸۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن عصاره الکلی کلاله زعفران را به‌صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند. در همه موارد عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن سالین ایزوتونیک حل گردید. میزان قند خون قبل و ۲، ٤، ٦ و ۸ ساعت پس از دریافت عصاره اندازه‌گیری شد.

طرح آزمایش:

تعداد۷۲ سر موش‌صحرایی نژاد ویستار نر به‌طور تصادفی در ٦ گروه ۱۲ تایی (سالم، سالم تیمار با عصاره، دیابتیک ملایم، دیابتیک ملایم تیمار با عصاره، شدیداً دیابتیک و شدیداً دیابتیک تیمار با عصاره) توزیع گردیدند.

موش‌های گروه‌های تیمار با عصاره به‌مدت ۳۰ روز تحت تزریق داخل صفاقی عصاره الکلی کلاله زعفران با دز ٤۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن (در ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن سالین ایزوتونیک) قرار گرفتند و

گروه‌های شاهد مربوطه نیز به همان روش فقط سالین نرمال به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. موش‌های مورد مطالعه توسط ایجاد جابه‌جایی در مهره‌های گردن به راحتی کشته شده و کبد و کلیه آن‌ها خارج گردید. جهت تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی، قسمت‌هایی از بافت‌های کبد و کلیه جدا و در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار گردید. از نمونه‌های پایدار شده در فرمالین، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون جهت رنگ‌آمیزی با H&E (هماتوکسیلین-ائوزین) و PAS (پریودیک- اسید- شیف) تهیه شد.

تعیین سمّیت حادّ (LD50):

برای تعیین سمّیت حادّ (LD50)، ۲٤ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته در ٦ گروه چهارتایی توزیع و عصاره الکلی زعفران با دزهای ۵، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی و به شکل محلول در سالین نرمال به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به آن‌ها تزریق شد. سپس موش‌ها به مدت ٦ ساعت به فواصل یک ساعته و بالاخره در پایان ۲٤ ساعت از لحاظ رفتارهای ظاهری، علایم عصبی، میزان مصرف غذا، وضعیت مدفوع و ادرار و مرگ تحت نظر بودند. تعداد مرگ و میر بعد از ۲٤ ساعت اندازه‌گیری شد. LD50 با روش Litchfield and Wilcoxon با استفاده از نرم‌افزار PCS تعیین گردید (۱۹٤۹).

نتایج

تعیین مؤثرترین دز عصاره الکلی کلاله زعفران بر میزان قند خون در موش‌های صحرایی سالم:

نتایج تأثیر دزهای مختلف عصاره الکلی کلاله زعفران بر میزان قند خون موش‌های صحرایی سالم متعاقب تزریق داخل صفاقی در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان قند خون در گروه شاهد تغییر معنی‌داری را در زمان‌های مختلف (۲، ٤، ٦ و ۸ ساعت پس از تزریق سالین ایزوتونیک) نشان نداد. تزریق عصاره در تمامی دزهای مصرف شده (۲۰، ٤۰ و ۸۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، کاهش قند خون معنی‌داری را ٦ ساعت بعد از تزریق نشان داد ($p<۰/۰۵$) و این کاهش با دز ٤۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، بیشتر بود. دز ٤۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کاهش قند خون معنی‌داری را (۳۳/۹ درصد)، ٦ ساعت پس از تزریق عصاره ایجاد کرد ($p<۰/۰۵$). کاهش ۲۱/۵ و ۲۷/۳ درصدی در میزان قند خون، به‌ترتیب با دزهای ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، ٦ ساعت پس از تریق عصاره ایجاد شد. ۸ ساعت پس از تزریق، افزایش جزئی و غیر معنی‌داری در میزان قند خون گروه‌های تیمار با عصاره مشاهده شد. بر این اساس، مؤثرترین دز عصاره الکلی کلاله زعفران بر میزان قند خون موش‌های صحرایی سالم، ٤۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین گردید.

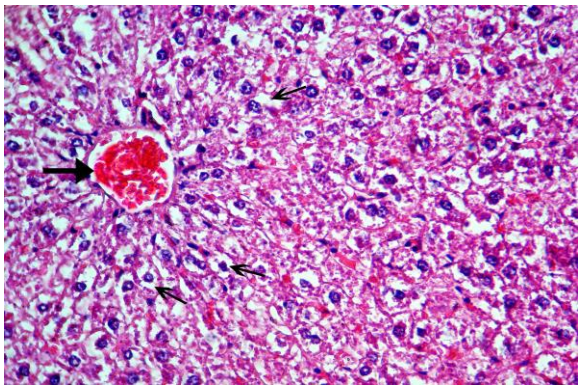
جدول۱- اثرات کاهش قند خون دزهای مختلف عصاره الکلی کلاله زعفران پس از تزریق داخل صفاقی در موش‌های صحرایی سالم (mean±S.D.)

گروه‌های آزمایش	دز (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	میزان قند خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)				
		قبل از تیمار (ساعت)	پس از تیمار (ساعت)			
		۰	۲	٤	٦	۸
سالین نرمال (شاهد)	-	۸۵/٤±۲/٤	۸۷/۷±۳/۲	۸۵/۹±۳/٦	۸۵/٤±۲/٦	۸۳/٤±۵/۲
عصاره الکلی	۲۰	۸۳/٤±۲/۳	۸۱/۷±٤/۲	۷۹/٤±۵/۳	۷۲/۲±۲/۲*	۷٤/۳±٤/٦*
عصاره الکلی	٤۰	۸٦/۲±٤/۱	۸۳/۸±۲/۲	۷۹/۷±۲/۸	٦۸/۹±۳/٤*	۷۰/۹±۵/۳*
عصاره الکلی	۸۰	۸٤/۸±٤/۸	۸۲/۱±٤/٦	۷۸/۲±۷/۳	۷۱/۱±٦/۳*	۷۲/۳±٤/۰*

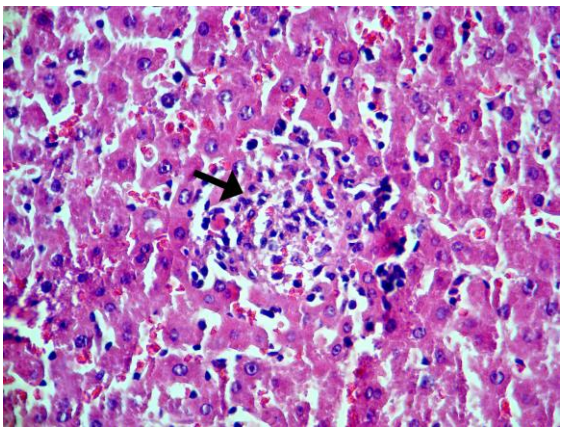
اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد: * $p<۰/۰۵$ و ** $p<۰/۰۱$.

آسیب‌شناسی بافتی کبد:

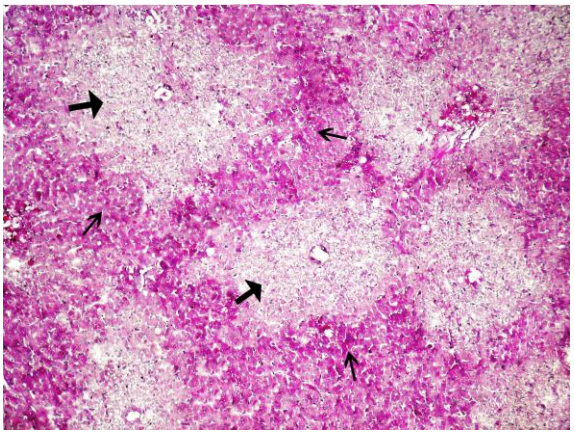
تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد در موش‌های صحرایی دیابتیک و شاهد در نگاره‌های ۱ تا ۹ نشان داده شده است. در مطالعات ریزبینی کبد موش‌های دیابتیک، پرخونی وریدچه مرکزی و تورّم هپاتوسیت‌های اطراف وریدچه مرکزی به‌دلیل واکوئولاسیون شدید سیتوپلاسم قابل مشاهده بود به طوری‌که، این تغییرات در گروه شدیداً دیابتیک بسیار آشکار و مناطق گسترده‌تری از کبد را درگیر کرده بود. همچنین، در کبد موش‌های شدیداً دیابتیک، در نواحی مرکز لوبولی کانون‌های متعدد نکروز با تجمعی از سلول‌های کوپفر با فعالیت فاگوسیتوزی مشاهده می‌شد. در رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS (پریودیک اسید شیف)، سلول‌های نواحی مرکز لوبولی با سلول‌های نواحی اطراف لوبولی کبد موش‌های دیابتیک از لحاظ محتوای گلیکوژن متفاوت بودند به‌طوری‌که، این تفاوت در کبد موش‌های شدیداً دیابتیک کاملاً مشخص بود. در فضای پورتال کبد موش‌های شدیداً دیابتیک ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی از نوع تک‌هسته‌ای نیز مشاهده می‌شد که گاهی اوقات ضایعه توسعه یافته و پل‌های آماسی با سلول‌های تک هسته‌ای بین لوبول‌های کبدی تشکیل شده بود. در مطالعه آسیب‌شناسی کبد موش‌های صحرایی دیابتیک تیمار شده با عصاره زعفران، آسیب مهم و قابل توجّهی به‌جز کانون‌های کوچک و پراکنده دژنراسیون سلول‌های کبدی و بعضاً اتساع سینوزوئیدها مشاهده نشد. جلوگیری از بروز آسیب در کبد موش‌های دیابتیک ملایم، با تیمار توسط عصاره زعفران بسیار قابل توجه بود به‌طوری‌که، کبد این موش‌ها از لحاظ ریزبینی تقریباً نرمال بوده و طبیعی به‌نظر می‌رسید و تفاوت قابل ملاحظه‌ای با کبد موش‌های گروه شاهد نداشت. در گروه‌های دیابتیک تیمار با عصاره، از لحاظ محتوای گلیکوژن نیز تفاوت چندانی بین هپاتوسیت‌های نواحی اطراف و مرکز لوبولی مشاهده نشد، هر چند که این بهبودی در گروه شدیداً دیابتیک به‌طور کامل حاصل نشده بود. لازم به‌ذکر است که، تفاوت قابل ملاحظه‌ای از لحاظ هیستولوژیکی بین گروه‌های شاهد و شاهد تیمار با عصاره مشاهده نشد.



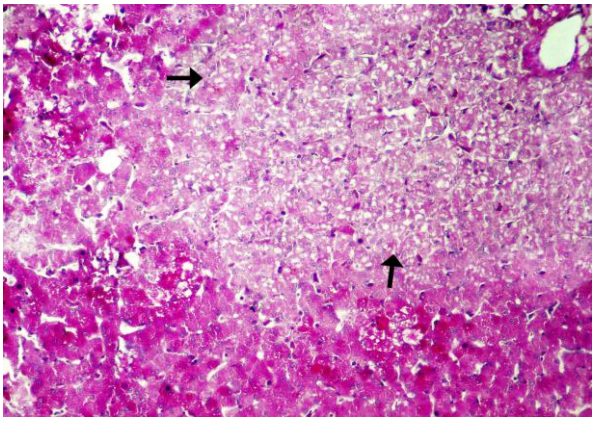
نگاره ۱- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک ملایم. پرخونی وریدچه مرکزی (فلش ضخیم) و تورّم هپاتوسیت‌های اطراف وریدچه مرکزی به‌دلیل واکوئولاسیون شدید سیتوپلاسم (فلش‌های باریک) قابل مشاهده است (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤۰۰×).



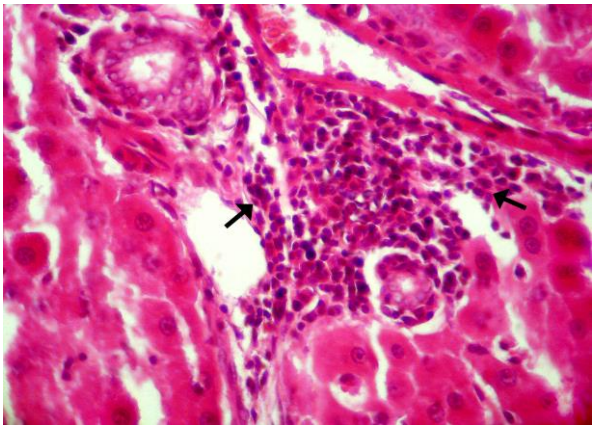
نگاره ۲- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک شدید. در نواحی مرکز لوبولی کانون‌های متعدد نکروز با تجمعی از سلول‌های کوپفر (فلش) با فعالیت فاگوسیتوزی مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



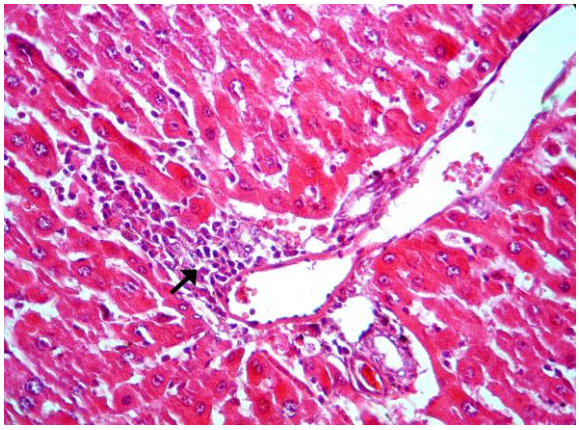
نگاره ۳- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک شدید. هپاتوسیت‌های نواحی مرکز لوبولی (فلش های ضخیم) از لحاظ محتوای گلیکوژن با سلول‌های نواحی اطراف لوبولی (فلش های باریک) متفاوت هستند (پریودیک- اسید- شیف، درشت‌نمایی ٤٠×).



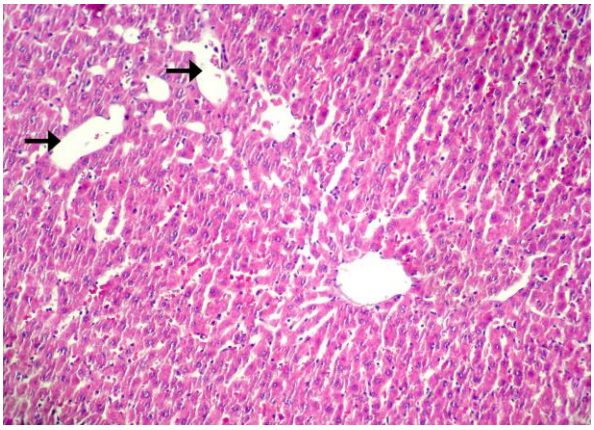
نگاره ٤- نمای ریزبینی با درشتنمایی بیشتر از کبد موش صحرایی دیابتیک شدید. تخلیه گلیکوژن در سلول‌های ناحیه مرکز لوبولی (فلش‌ها) مشخص می‌باشد (پریودیک- اسید- شیف، درشت‌نمایی ١٠٠×).



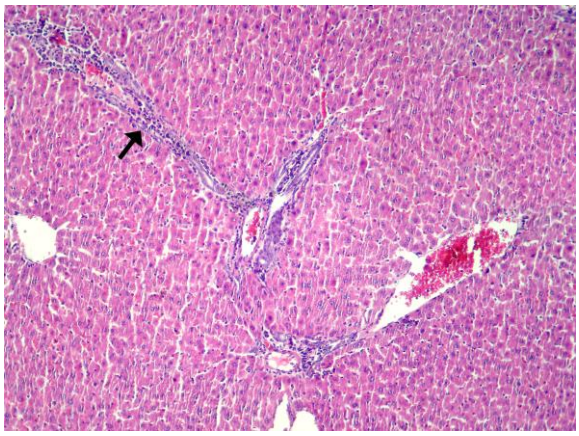
نگاره ۵- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک شدید. ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی (فلش) از نوع تک‌هسته‌ای در فضای پورتال کبد مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٦٠٠×).



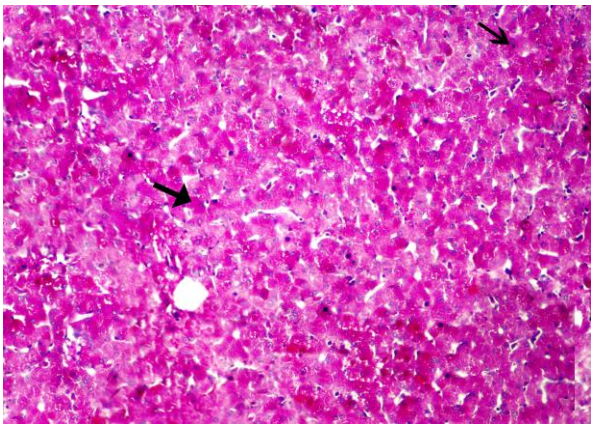
نگاره ٦- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک ملایم. ارتشاح متوسط سلول‌های آماسی (فلش) از نوع تک‌هسته‌ای در فضای پورتال کبد مشاهده می‌شود
(هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



نگاره ۸- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی شدیداً دیابتیک تیمار شده با عصاره الکلی کلاله زعفران. تغییرات دژنراتیو خفیف در سلول‌های کبدی همراه با اتساع سینوزوئیدها (فلش‌ها) مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠×).



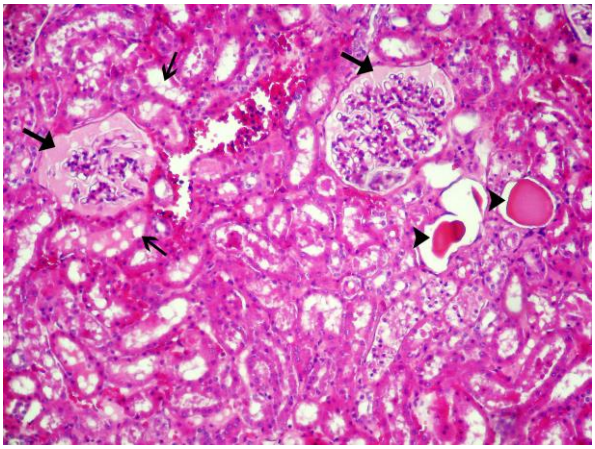
نگاره ۷- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک شدید. ارتشاح فراوان سلول‌های آماسی از نوع تک‌هسته‌ای با تشکیل پل‌های آماسی (فلش) بین لوبولی قابل مشاهده است (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠×).



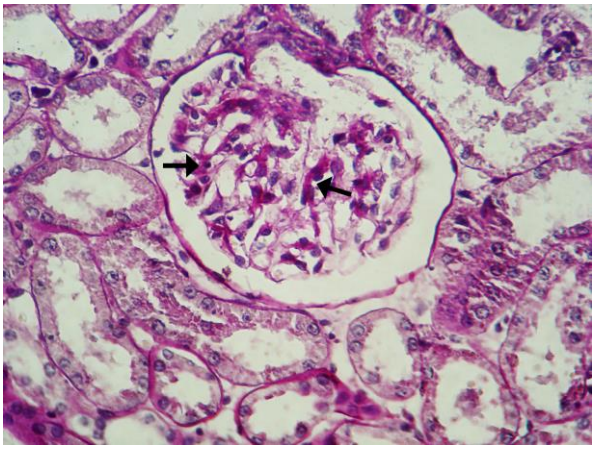
نگاره ۹- نمای ریزبینی از کبد موش صحرایی دیابتیک ملایم تیمار شده با عصاره الکلی کلاله زعفران. از لحاظ محتوای گلیکوژن تفاوت چندانی بین سلول‌های نواحی اطراف (فلش باریک) و مرکز لوبولی (فلش ضخیم) مشاهده نمی‌شود (پریودیک- اسید- شیف، درشت‌نمایی ۱۰۰×).

آسیب‌شناسی بافتی کلیه:

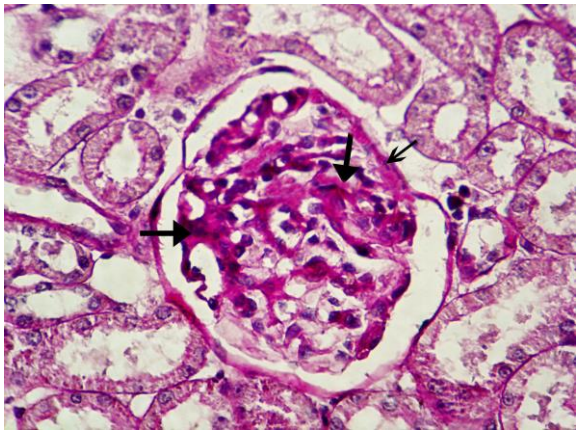
تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه در موش‌های صحرایی دیابتیک و شاهد در نگاره‌های ۱۰ تا ۲۱ نشان داده شده است. در بافت کلیه موش‌های دیابتیک، افزایش ضخامت غشاءهای پایه گلومرولی و افزایش ماتریکس مزانژیال مشاهده شد. اتساع فضای ادراری همراه با تجمع قطرات ریز هیالنی پروتئینی (Hyaline proteinaceouse droplets) در آن، چسبندگی پرده‌های احشایی و جداری کپسول بومن (Synechiae) و هیپرسلولاریتی ملایم مزانژیال همرا با پرخونی و گاهی اوقات نکروز سلول‌های سنگفرشی پرده جداری کپسول بومن نیز قابل مشاهده بود. در لوله‌های ادراری تورم سلول‌های پوششی و افزایش ضخامت غشاءبازال توبولی نیز قابل توجه بود. کست‌های هیالن که در برخی مواقع با انسداد و اتساع توبول‌ها همراه بودند، در داخل توبول‌ها قابل مشاهده بودند. در برخی مناطق نکروز حادّ توبول‌ها که با جدا شدن سلول‌های اپی‌تلیال از غشاء بازال همراه بود، در هر دو نوع توبول (پروگزیمال و دیستال) مشاهده می‌شد. مناطق پرخونی و خونریزی همراه با ادم و ارتشاح لنفوسیتی در بافت بینابینی کلیه کاملاً مشخص بود. تغییرات پاتولوژیک ذکر شده در گروه شدیداً دیابتیک، گسترده‌تر و مشخص‌تر از گروه دیابتیک ملایم بود. بین گروه‌های شاهد و شاهد تیمار با عصاره نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای از لحاظ هیستولوژیکی مشاهده نشد. عصاره الکلی کلاله زعفران به‌طور قابل ملاحظه‌ای مانع از بروز آسیب‌های پاتولوژیک فوق در گروه‌های دیابتیک مربوطه شده بود به‌طوری‌که، در گروه دیابتیک ملایم بافت کلیه از لحاظ هیستولوژی تقریباً نرمال به‌نظر می‌رسید. در گروه شدیداً دیابتیک نیز به‌جز پرخونی جزعی و تورم در سلول‌های توبولی، آسیب قابل توجّهی مشاهده نشد.



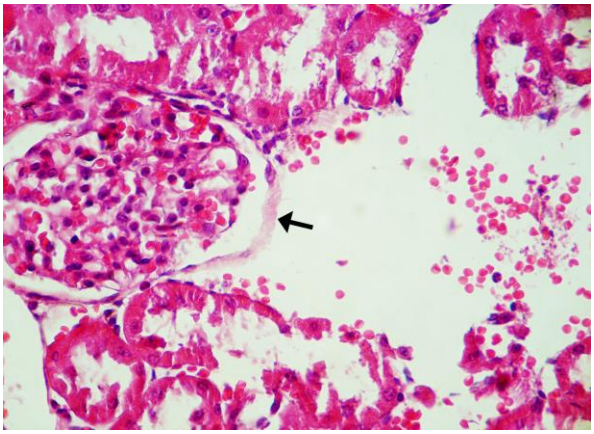
نگاره ۱۰- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. اتساع فضاهای ادراری همراه با تجمع مواد پروتئینی (فلش‌های ضخیم)، تورم سلول‌های اپی‌تلیال به‌طرف مجرای داخل توبول‌ها (فلش‌های باریک)، کست‌های هیالن (نوک فلش‌ها) که باعث انسداد و اتساع برخی توبول‌ها شده‌اند و خونریزی در بافت بینابینی کلیه در این تصویر مشخص می‌باشد (پریودیک- اسید- شیف، درشت‌نمایی ٤٠×).



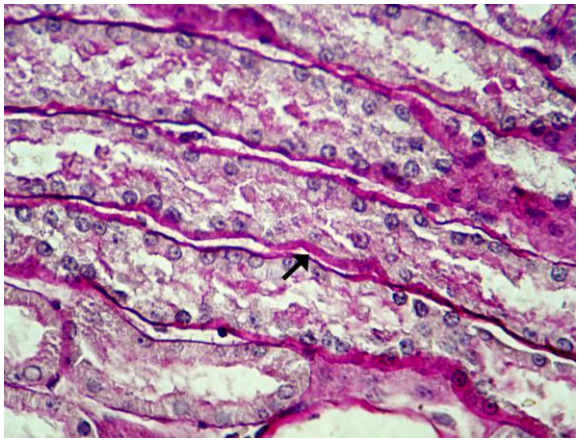
نگاره ۱۱- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک ملایم. افزایش خفیف ضخامت غشاءهای پایه گلومرولی (فلش‌ها) در این تصویر مشخص می‌باشد (پریودیک- اسید- شیف، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



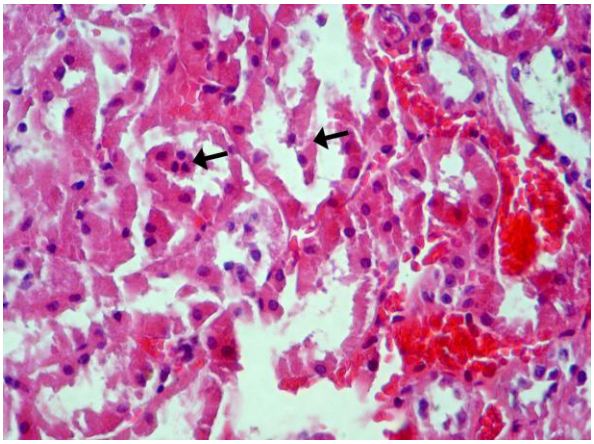
نگاره ۱۲- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. افزایش قابل توجه ضخامت غشاءهای پایه مویرگی (فلش‌های ضخیم) و ماتریکس مزانژیال در این تصویر مشخص می باشد. به چسبندگی پرده‌های احشایی و جداری کپسول بومن (فلش نازک) نیز توجه فرمائید (پریودیک- اسید - شیف، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



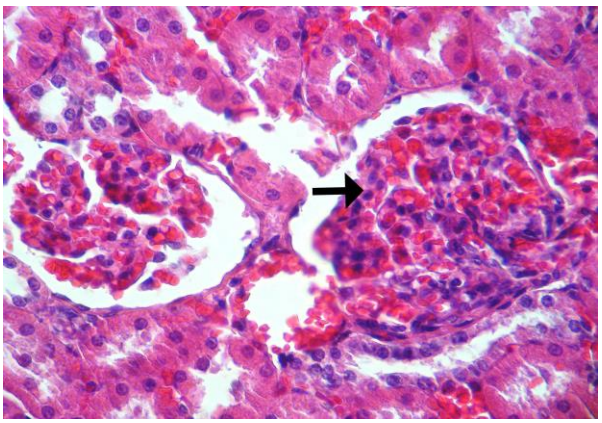
نگاره ١٤- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. هیپرسلولاریتی ملایم مزانژیال همراه با پرخونی گلومرولی، نکروز سلول‌های پوششی توبول‌های کلیه و سلول‌های سنگفرشی پرده جداری کپسول بومن (فلش) همراه خونریزی و ادم در بافت بینابینی کلیه مشخص می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



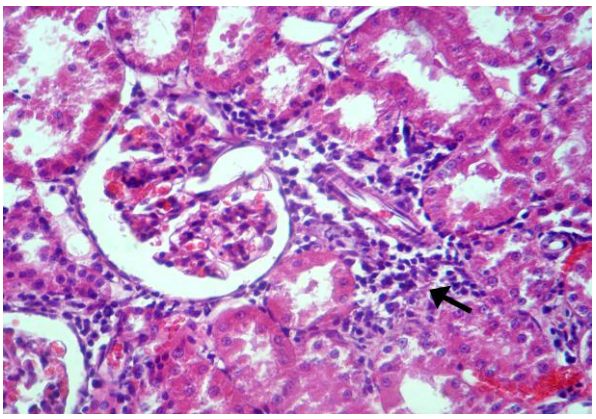
نگاره ١٣- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. افزایش قابل توجه ضخامت غشاءهای پایه لوله‌های ادرای (فلش) در این تصویر مشخص می باشد (پریودیک اسید شیف، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



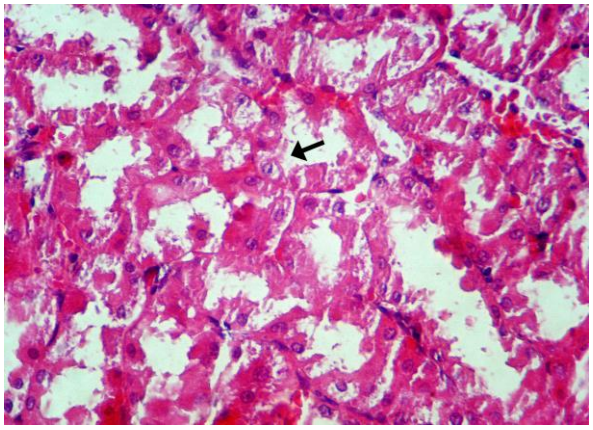
نگاره ١٥- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. نکروز حادّ توبول‌ها که با انفصال سلول‌های اپی‌تلیال از غشاء بازال همراه است، در این تصویر مشخص می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



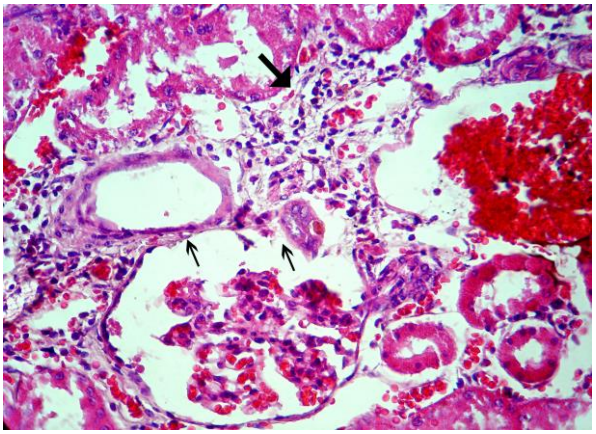
نگاره ۱۶- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. هیپرسلولاریتی مزانژیال همراه با پرخونی گلومرولی، (فلش) در این تصویر مشخص می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



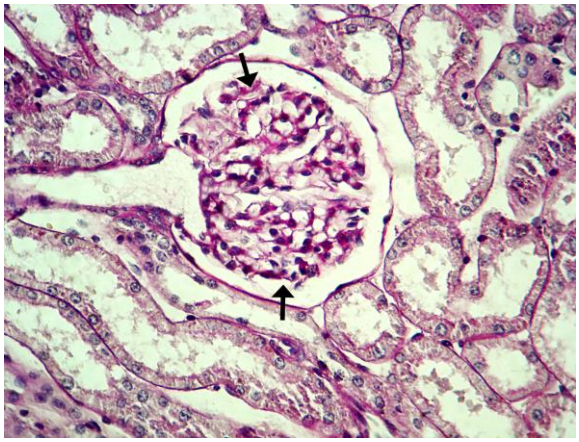
نگاره ۱۸- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید. مناطق پرخونی و ارتشاح لنفوسیت‌ها (فلش) در بافت بینابینی کلیه به‌خصوص در اطراف گلومرول در این تصویر مشخص می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



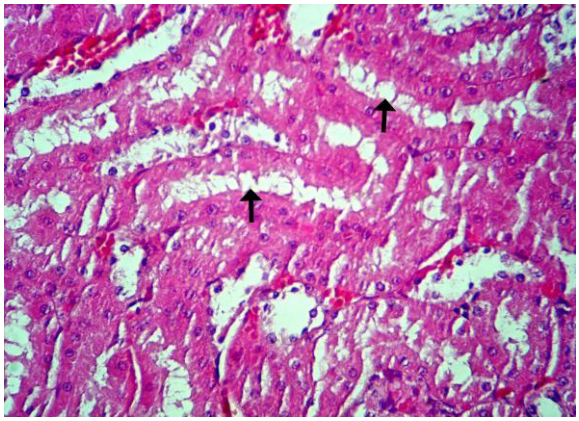
نگاره ۱۷- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک ملایم. تغییرات شدید دژنراتیو سلول‌های توبولی به شکل واکوئولاسیون شدید سیتوپلاسم (فلش) در این تصویر مشخص می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



نگاره ۱۹- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک ملایم. مناطق پرخونی و خونریزی همرا با ارتشاح لنفوسیت‌ها (فلش ضخیم) در بافت بینابینی کلیه و اتساع فضای ادراری همراه با نکروز سلول‌های سنگفرشی پرده جداری کپسول بومن (فلش‌های نازک) در این تصویر مشخص می‌باشد (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۴۰۰×).



نگاره ۲۰- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید تیمار شده با عصاره زعفران. به‌ضخامت تقریباً نرمال غشاءهای پایه گلومرولی توجه فرمائید (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠٠×).



نگاره ۲۱- نمای ریزبینی از کلیه موش صحرایی دیابتیک شدید تیمار شده با عصاره زعفران. به‌جز پرخونی جزعی و تورم سلول‌های توبولی، آسیب قابل توجهی مشاهده نمی‌شود (هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ٤٠٠×).

تعیین سمیّت حاد (LD50):

از آن‌جائی‌که هیچ‌گونه اثر توکسیک و یا مرگی با تزریق داخل صفاقی دزهای مختلف تا ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره الکلی کلاله زعفران در موش‌های صحرایی مشاهده نشد، بنابراین، عصاره فوق برای مطالعات بیولوژیک بعدی بی‌خطر و مطمئن شناخته شد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که تأثیر عصاره الکلی کلاله زعفران بر میزان قند خون تا دز ٤٠ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، وابسته به دز می‌باشد. میزان قند خون تا ٢٦/٦ و ٣٣/٩ درصد به‌ترتیب بعد از ٤ و ٦ ساعت در موش‌های سالمی که با دز ٤٠ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره تیمار شده بودند، کاهش پیدا می‌کند، در حالی‌که دز ٨٠ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن، کاهشی به‌میزان ١٩/١ و ٢٧/٣ درصد به‌ترتیب بعد از ٤ و ٦ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی ایجاد می‌کند. بنابراین، مشخص می‌گردد که دز ٨٠ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره الکلی کلاله زعفران کاهشی را که در میزان قند خون ایجاد می‌کند علی‌رغم معنی‌دار بودن وابسته به دز نمی‌باشد. به‌نظر می‌رسد که دزهای بالاتر عصاره الکلی کلاله زعفران به‌دلیل حضور برخی مواد موجود در عصاره که احتمالاً با تأثیر هیپوگلیسمی آن مداخله می‌کنند، کاهش قابل توجهی را در میزان قند خون ایجاد نمی‌کنند. بررسی‌هایی که قبلاً در مورد اثرات هیپوگلیسمی گیاهانی نظیر *Aegle marmelos* (Sharma et al., 1996a)، *Murraya koenigii* (Kesari et al., 2005)، *Cinnamomum tamala* (Sharma et al., 1996b) و *Aegle marmelos* (Kesari et al., 2006) انجام شده، نیز دلالت بر همین موضوع دارند.

پر واضح است که نفروپاتی دیابتی توسط فاکتورهای متعددی ایجاد می‌گردد و لذا تنها از طریق کنترل هیپرگلیسمی و فشار خون قابل پیشگیری نیست (Liu et al., 2008). اگرچه در مراحل اولیه بیماری، تغییرات نفروپاتی دیابتی توسط هیپرگلیسمی القاء می‌شود، اما آسیب‌های بعدی به ابقاء هیپرگلیسمی ارتباط ندارد (Vestra and Fioretto, 2003). از اینرو، کنترل گلوکز خون به‌تنهایی برای به‌تعویق انداختن روند نفروپاتی دیابتی کافی نیست. استرس‌های اکسیداتیو توأم با افزایش تولید ECM (Extra cellular matrix) نقش

اساسی در آسیب‌های پاتولوژیک کلیوی دارند. در بررسی حاضر، کبد و کلیه موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان، دچار آسیب‌های سلولی متعددی شده بودند که این آسیب‌ها احتمالاً با آسیب غشاءهای سلولی همراه بوده است که ممکن است در اثر استرس‌های اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی ایجاد شده باشند. هیپرگلیسمی باعث افزایش تولید AGEs (Advanced glycation end products) می‌گردد که باعث تسهیل در تولید رادیکال‌های آزاد از طریق اختلال در تولید زداینده‌های درونزاد ROS (Reactive oxygen species) مثل SOD (Superoxide desmotase) و کاتالاز می‌گردند (Kalia et al., 2004; Cameron et al., 2005; Jandeleit-Dahm et al., 2005). استرس اکسیداتیو ناشی از آنیون‌های سوپراکسید (Superoxide anions) در پاتوفیزیولوژی نفروپاتی دیابتی دخیل می‌باشد (Vural et al., 2002). بنابراین چنین برمی‌آید که محافظت بافت کلیه توسط عصاره الکلی کلاله زعفران در دیابت تجربی، علاوه بر کاهش قند خون (Mohajeri et al., 2008) به خاصیت ضد رادیکال آزاد آن نیز ارتباط داشته باشد. اخیراً گزارش شده است که کروسین (Crocin) و سافرانال (Safranal) موجود در عصاره زعفران، خاصیت ضد رادیکال آزاد داشته و می‌توانند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کنند (Assimopoulou et al., 2005).

آسیب مهم دیگری که در کلیه موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان در بررسی حاضر مشاهده شد، افزایش ضخامت غشاءهای پایه گلومرولی و ماتریکس مزانژیال بود. افزایش ماتریکس مزانژیال در نفروپاتی دیابتی، در ارتباط با تغییرات ماتریکس خارج سلولی می‌باشد (Yamanea et al., 2004). مشخص شده است که در بیماری دیابت، هیدروکسی‌پرولین که از اجزای ویژه کلاژن بافتی است، در کلیه افزایش می‌یابد (Liu et al., 2008). افزایش ماتریکس مزانژیال با افزایش سنتز کلاژن نوع ٤ که یکی از اجزاء ماتریکس خارج سلولی در کلیه است، حاصل می‌گردد (Kotajima et al., 2000). مشخص شده است که MMPs (Matrix metalloproteinase) مسئول تجزیه و زوال ماتریکس خارج سلولی هستند و در این میان MMP2 و MMP9 به‌طور اختصاصی مسئول تجزیه و نابودی کلاژن هستند (Midwood et al., 2004; Sottile, 2004). در نفروپاتی دیابتی فعالیت MMP2 و MMP9 کاهش می‌یابد که در نهایت به افزایش EMC منجر خواهد شد. این احتمال وجود دارد که عصاره الکلی زعفران باعث بازگشت فعالیت MMP2 و MMP9 به حالت طبیعی گردیده که مانع از افزایش ماتریکس مزانژیال و در نهایت اسکلروز گلومرولی و فیبروز کلیه‌ها می‌شود.

گزارش شده است که محتوای گلیکوژن کبد و عضلات اسکلتی در بیماری دیابت در مقایسه با شاهدهای غیر دیابتی به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که این یافته با نتایج بررسی حاضر نیز همخوانی دارد (Welihinda and Karunanayake, 1986). در این مطالعه، تیمار با عصاره الکلی زعفران مانع از بروز تغییرات قابل ملاحظه در محتوای گلیکوژن کبد موش‌های دیابتیک شده است. ممانعت از تخلیه گلیکوژن کبد می‌تواند ناشی از تحریک آزادسازی انسولین از سلول‌های بتا باشد (Sharma et al., 2003) و یا اینکه ترکیبات عصاره همانند انسولین می‌توانند در سنتز گلیکوژن در کبد دخالت کنند (Davis and Granner, 2001) که این خود در راستای تأئید مکانیسم اثر عصاره در جهت کاهش میزان قند خون به هر دو طریق مستقیم و غیر مستقیم می‌باشد. بنابراین چنین برمی‌آید که عصاره الکلی کلاله زعفران می‌تواند در هر دو نوع دیابت (وابسته به انسولین و غیر وابسته به انسولین) مؤثر و مفید واقع گردد.

با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، عصاره الکلی زعفران می‌تواند پس از انجام کارآزمایی‌های بالینی شاهددار اتفاقی به‌عنوان یک عامل پیشگیری‌کننده و یا درمانی بی‌خطر علیه هپاتوپاتی و نفروپاتی در دیابت ملیتوس مورد استفاده قرار گیرد، لکن،

شناخت دقیق ماده یا مواد مؤثر اصلی این عصاره، تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات آتی دارد.

فهرست منابع

۱. ابراهیم زاده، ح.، رجبیان، ط.، ابریشم‌چی، پ.، کرمیان، ر. و صبورا ع. (۱۳۸۵): زعفران ایران با نگاه پژوهشی، چاپ اول، انتشارات اطلاعات، صفحات: ۵۹۱-۵۸۷.

۲. کافی، م. (۱۳۸۱): زعفران: فنآوری تولید و فرآوری، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات: ۱۳۵-۲۱ و ۲۷۵-۲۰۹.

3. Abdullaev, F.I. (2002): Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp. Biol. Med., 227(1): 20-25.
4. Abe, K. and Saito, H. (2000): Effects of saffron and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. Phytother. Res., 14(3): 149-152.
5. Akhtar, M.S. and Iqbal, J. (1991): Evaluation of the hypoglycemic effect of Achyranthes aspera in normal and alloxan diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol., 31(1): 49-57.
6. Assimopoulou, A.N., Sinakos, Z. and Papageorgiou, V.P. (2005): Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents. Phytother. Res., 19(11): 997-1000.
7. Bailey, L.J. and Day, C. (1989): Traditional plant medicine as treatment for diabetes. Diabetes Care, 12(8): 553-564.
8. Cameron, N.E., Gibson, T.M., Nangle, M.R. and Cotter, M.A. (2005): Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes, Annual New York Academic Science, 1043: 784–792.
9. Davis S.N. and Granner, D.K. (2001): Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas, Goodman Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics (10th ed.), The McGraw-Hill Companies Inc., USA, pp: 1690.
10. Duke, J.A. (2000): *Crocus sativus* L. (Iridaceae)-Saffron. Saffron crocus. Handbook of Medicinal Herbs. pp: 148-149.
11. El Daly, E.S. (1998): Protective effect of cysteine and vitamin E, Croucus sativus and Nigella sativa Extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. J. Pharm. Belg., 53(2): 87-95.
12. Giaccio, M. (2004): Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 44(3): 155-172.
13. Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G. (2005): Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of Ethanolic Extract of Leaves of Annona squamosa L. in Experimental Animals. J. Ethnopharmacol., 99(1): 75-81.
14. Holman, R.R. and Turner, R.C. (1991): Oral agents and insulin in the treatment of NIDDM. In: J. Pickup and G. Wiliams (Eds.), Textbook of Diabetes. Blackwell, Oxford, pp: 407–469.
15. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Ziaee, T. and Danaee, A. (2005): Protective effect of aqueous saffron extract (Crocus sativus L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. J. Pharm. Pharm.Sci., 8(3): 387-93.
16. Ivorra, M.D., Paya, M. and Villar, A. (1989): A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. J. Ethnopharmacol., 27(3): 243-275.
17. Jandeleit-Dahm, K.A., Lassila, M. and Allen, T.J. (2005): Advanced glycation end products in diabetes-associated atherosclerosis and renal disease: interventional studies, Annual New York Academic Science, 1043: 759–766.

18. Kalia, K., Sharma, S. and Mistry, K. (2004): Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy, Clinical & Chemical Acta, 347: 169–176.
19. Kesari, A.N., Gupta, R.K. and Watal, G. (2005): Hypoglycemic effects of Murraya koenigii on normal and alloxan diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol., 97(2): 247-251.
20. Kesari, A.N., Gupta, R.K., Singh, S.K., Diwakar, S. and Watal, G. (2006): Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of Aegle marmelos seed extract in normal and diabetic rats. J. Ethnopharmacol., 107(3): 374-379.
21. Kotajima, N., Kimura, T., Kanda, T., Obata, K., Kuwabara, A., Fukumura, Y. and Kobayashi, I. (2000): Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus, Journal of Diabetes Complication, 14: 13–17.
22. Larner, J. (1985): Insulin and oral hypoglycemic drugs; Glucagon. In: A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall and F. Murad, (Eds.), The Pharmacolgical Bases for Therapeutic. (7ed.), Macmillan, New York, pp: 149–151.
23. Liu, H.R., Tang, X.Y., Dai, D.Z. and Dai, Y. (2008): Ethanol extracts of *Rehmannia* complex (Di Huang) containing no *Corni fructus* improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats Journal of Ethnopharmacology, 118(3): 466-472.
24. Luo, J., Fort, D.M., Carlson, T.J., Noamesi, B.K., nii-Amon-Kotei, D., King, S.R., Tsai, J., Quan, J., Hobensack, C., Lapresca, P., Waldeck, N., Mendez, C.D., Jolad, S.D., Bierer, D.E. and Reaven, G.M. (1998): Cryptolepis sanguinolenta: an ethnobotanical approach to drug discovery and the isolation of a potentially useful new antihyperglycaemic agent. Diabet. Med., 15(5): 367-374.
25. Marles, R.J. and Farnsworth, N.R. (1995): Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine, 2(2): 137–189.
26. Midwood, K.S., Williams L.V. and Schwarzbauer, J.E. (2004): Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix, International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: 1031–1037.
27. Mohajeri, D., Amouoghli Tabrizi, B., Mousavi, Gh. and Mesgari, M. (2008): Anti-diabetic activity of Crocus sativus L. (Saffron) stigma ethanolic extract in alloxan-induced diabetic rats. Research of Biological science. 3(9): 1102-1108.
28. Pickup, J.C. and William, G. (1997): Epidemiology of diabetes mellitus. Textbook of Diabetes, vol. I (second ed.), Blackwell, Oxford, pp. 3.1–3.28.
29. Ríos, J.L., Recio, M.C., Giner, R.M. and Máñez, S. (1996): An update review of saffron and its active constituents. Phytother. Res., 10(3): 189-193.
30. Sharma, S.R., Dwivedi, S.K., Varshney, V.P. and Swarup, D. (1996): Antihyperglycemic and Insulin release effects of Aegle marmelos leaves in streptozotocin-diabetic rats, Phytother. Res., 10(5): 426–428.
31. Sharma, S.R., Dwivedi, S.K. and Swarup, D., (1996): Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of Cinnamomum tamala Nees leaves, Indian J. Exp. Biol., 34(4): 372-374.
32. Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S. and Dev, G. (2003): Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of Eugenia jambolana in alloxan-induced diabetic rabbits.Journal of Ethnopharmacology, 85(2-3): 201-206.
33. Soeda, S., Ochiai, T., Paopong, L., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Shimeno, H. (2001): Crocin suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. Life Sci., 69(24): 2887-98.
34. Sottile, J. (2004): Regulation of angiogenesis by extracellular matrix, Biochemistry & Biophysics Acta., 1654: 13–22.
35. Vestra M.D. and Fioretto, P. (2003): Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients, Internatrional Congress Series, 1253: 163–169.

36. Vural, P., Cevik, A., Curgunlu, A. and Canbaz, M. (2002): Effects of diabetes mellitus and acute hypertension on plasma nitricoxide and endothelin concentrations in rats, Clinical & Chemical Acta, 320: 43–47.
37. Welihinda, J. and Karunanayake, E.H. (1986): Extra pancreatic effect of *M. charantia* in rats. Journal of Ethanopharmacology, 173: 247–255.
38. WHO. (1980): expert committee on Diabetes mellitus, Technical reports series World Health Organization, Geneva.
39. Yamanea, T. Yamaguchib, N. Yoshidaa Y. and Mitsumatac, M. (2004): Regulation of extracellular matrix production and degradation of endothelial cells by shear stress, International Congress Series, 1262: 407–410.